

DIAGNOSTIC MEANS OF CAT-INFECTIOUS PERITONITIS VIRUS

Patent number: JP2291273
Publication date: 1990-12-03
Inventor: BIBARII DEIRU; MAIRUSU YAMANAKA; UIRIAMU ENU AKURII; ROIDO JII SHIYABE JIYUNIA
Applicant: CALIFORNIA BIOTECHNOLOGY INC.; AMERICAN HOME PROD
Classification:
- **international:** C07K13/00; G01N33/569; C12N5/10; C12N15/06; C12N15/50; C12P21/02; C12P21/08
- **european:** C07K14/165; C07K16/10; C12N15/863V
Application number: JP19890345009 19891228
Priority number(s): US19880292527 19881230

Also published as:

- EP0376744 (A1)
- DK672789 (A)
- EP0376744 (B1)
- IE894222L (L)
- IE67650 (B1)

Report a data error here

Abstract not available for JP2291273

Abstract of corresponding document: **EP0376744**

The present invention provides tools which are useful for the diagnosis of an animal's exposure to feline infectious peritonitis virus (FIPV) or susceptibility to FIPV. The diagnostic tools are composed of nucleic acid sequences which encode structural and nonstructural FIPV proteins and antibodies generated against FIPV proteins. The FIPV proteins may also be useful as subunit vaccines.

Data supplied from the **esp@cenet** database - Worldwide

BEST AVAILABLE COPY

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B 2)

(11)特許番号

第2903129号

(45)発行日 平成11年(1999)6月7日

(24)登録日 平成11年(1999)3月26日

(51)Int.Cl.⁶
C 12 N 15/09
A 61 K 39/215
C 07 K 14/165
C 12 N 5/10
7/00

識別記号
ZNA

F I
C 12 N 15/00
A 61 K 39/215
C 07 K 14/165
C 12 N 7/00
C 12 P 21/02

ZNAA

C

請求項の数14(全 20 頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願平1-345009

(22)出願日 平成1年(1989)12月28日

(65)公開番号 特開平2-291273

(43)公開日 平成2年(1990)12月3日

審査請求日 平成8年(1996)12月20日

(31)優先権主張番号 292, 527

(32)優先日 1988年12月30日

(33)優先権主張国 米国 (U.S.)

(73)特許権者 99999999

サイオス インコーポレイテッド
アメリカ合衆国 カリフォルニア
94043 マウンテン ビュー, ベイショ
アー パークウェイ 2450

(73)特許権者 99999999

アメリカン ホーム プロダクツ コー
ボレイション
アメリカ合衆国 ニューヨーク
10017-4085 ニューヨーク, サード
アベニュー 685

(74)代理人 弁理士 山本 秀策

審査官 新見 浩一

最終頁に続く

(54)【発明の名称】ネコ伝染性腹膜炎ウイルスの診断手段

1

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】ネコ伝染性腹膜炎ウイルス(FIPV)感染によって引き起こされる疾患に対するネコの防御のためのワクチンであって、該ワクチンは、有効量の免疫原および非毒性の担体または希釈剤を含み、該免疫原は、

(a)組換え產生されたFIPVのE1タンパク質もしくはNタンパク質、または該E1およびNタンパク質の組合せ、あるいは

(b)FIPVのE1もしくはNタンパク質、または両方をコードするヌクレオチド配列であって、その発現のための制御配列に作動可能に連結されたヌクレオチド配列を含むウイルス粒子、

である、ワクチン。

【請求項2】前記免疫原が、組換え產生されたFIPVのE1タンパク質もしくはNタンパク質、または該E1およびN

10

タンパク質の組合せである、請求項1に記載のワクチン。

【請求項3】前記免疫原が、FIPVのE1もしくはNタンパク質、または両方をコードするヌクレオチド配列を含むウイルス粒子であって、ここで該ヌクレオチド配列は、その発現のための制御配列に作動可能に連結されている、請求項1に記載のワクチン。

【請求項4】前記組換え產生されたタンパク質が、昆虫細胞中でバキュロウイルス発現ベクターから調製される、請求項2に記載のワクチン。

【請求項5】前記制御配列が、異種ウイルスプロモーターを含む、請求項3に記載のワクチン。

【請求項6】アジュバントをさらに含む、請求項1～5のいずれかに記載のワクチン。

【請求項7】請求項1に記載のワクチンの產生のために

有用な組成物であって、該組成物は、FIPVのE1タンパク質もしくはNタンパク質、または両方をコードするヌクレオチド配列であって、その発現のための制御配列に作動可能に連結されたヌクレオチド配列を含む発現系を含有する核酸分子を含む、組成物。

【請求項8】前記E1タンパク質が、図1に示されるアミノ酸配列を有するか、または前記Nタンパク質が、図1に示されるアミノ酸配列を有する、請求項7に記載の組成物。

【請求項9】前記E1タンパク質が、図1に示されるアミノ酸配列を有し、かつ前記Nタンパク質が、図1に示されるアミノ酸配列を有する、請求項7に記載の組成物。

【請求項10】前記制御配列が、ヒトMT-IIプロモーター、ヒトβアクチンプロモーター、ワクシニア由来プロモーター、およびパキュロウイルスプロモーターからなる群より選択されるプロモーターを含む、請求項7～9のいずれかに記載の組成物。

【請求項11】請求項7～10のいずれかに記載の発現系を含むように改変された、組換え宿主細胞。

【請求項12】請求項7～10のいずれかに記載の発現系を含む、組換え体ウイルス粒子。

【請求項13】請求項7～10のいずれかに記載の発現系を含む、組換えベクター。

【請求項14】FIPVのE1もしくはNタンパク質、または両方を産生する方法であって、該方法は、該タンパク質の産生のために適切な条件下で、請求項11に記載の細胞を培養する工程を包含する、方法。

【発明の詳細な説明】

(産業上の利用分野)

本発明は、組換えDNA技術およびウイルス疾患の免疫予防法の分野におけるものである。さらに詳しくは、本発明は、ネコ伝染性腹膜炎(FIP)、組換え技術で製造されたFIPウイルスのタンパク、および診断法と予防法とにおけるこれらタンパクの使用に関する。

(従来の技術)

ネコ伝染性腹膜炎は、腎臓、肝臓、およびCNS(非滲出性もしくは「乾燥」形)を含む種々の器官の化膿肉芽腫性病巣の形成、あるいはフィブリン腹膜炎および/またはフィブリン胸膜炎(滲出性もしくは「湿潤」形)の発生、あるいは両方の特性の組合せを特徴とするネコの疾患である〔1984年8月、*Vet Clin North Am: Anim Pract*, 14(5):975-984; BarloughおよびStoddart(1986), *Contemporary Issues in Small Animal Practice Vol.3 Infectious Diseases* (F.W.Scott編) Churchill Livingstone, New York p.93-108〕。その病原はまだ充分には判明していないが、この疾患は、免疫に関連がある疾患であり、その一次病変は、血管内にアルチス様(Arthus-like)免疫複合体が沈積することが原因で起こる脈管炎および脈管周囲炎である。

ネコ伝染性腹膜炎ウイルス(FIPV)は、FIPの病因学的

因子である。FIPVウイルス抗原、IgG、および補体第3成分(C3)は、免疫蛍光法によってFIP病巣内に存在することが示されており、持続性のFIPV感染は、感染したネコのマクロファージと神経根内皮系の細胞とに確認されている。血清反応陰性の小ネコが攻撃される場合に比べて、FIPV抗体を有する小ネコが病原性のFIPVで攻撃される場合の方が、より劇症のFIPが起こる。

FIPVは、ゲノムの極性が陽性の一本鎖RNAウイルス(コロナウイルス科)である。そのRNAゲノムから、7～

10 9個のmRNAからなる入れ子集合(nestedset)が產生されるが、これらはすべてゲノムの3'末端で終止する。このウイルスがコードする主な構造タンパクには、45kDの非グリコシル化ヌクレオキナブシド(N)、26kDの外皮糖タンパク(E1)、および表面ベブロマー(E2)を構成する210kDの糖タンパクが含まれる。さらに、他のコロナウイルス類と同様に、FIPVに感染した細胞内で発現するが、FIPVのビリオンには取り込まれない非構造タンパク(NS1およびNS2)をコードするオープンリーディングフレームが存在する。

20 3種の原型ワクチンが開発されている。第1のワクチンでは、抗原的に関連する(しかし、ネコに対しては無発病性の)コロナウイルスを生ワクチンとして用い、中和抗体の力値が刺激される。これらのワクチンには、ブタの伝播性胃腸炎ウイルス(TGEV)および犬のイヌコロナウイルス(CCV)が含まれている。これらの研究の結果、ほとんど感作が生じないかまたは全く感作が起らぬ、したがって全く防御作用を示さないことが分かった(Barloughら、(1984) *Lab Anim Sci*, 34(6):592-597; WoodsおよびPedersen、(1979) *Vet Microbiol*, 4:1

30 1-16)。

第2の原型ワクチンでは、生きた相同FIPウイルスが用いられる(PedersenおよびBlack、(1983) *Am J Vet Res*, 44(2):229-234; PedersenおよびFloyd、(1985) *Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian*, 7:1001-1011)。試験の結果、防御作用が全くないことが分かり、ほとんどの場合、ネコは感作されるが、次いで病原性のウイルスに攻撃されるとFIPが悪化する。

40 第3の原型ワクチンは、PCT出願公開WO 87/04624に開示されているが、特異的な株の弱毒FIPウイルス(79-1146)が用いられる。この株は、生ワクチンとして用いた場合に、防御を行うが、感作を起こさないと述べられている。

別のある方法も試みられているが、FIPVに対して有効なワクチンの開発は確認されていない。今まで、充分に特性が決定された唯一のFIPV構造タンパクはE2もしくはベブロマーの糖タンパクである。E2をコードするcDNA配列はクローニングされ、DeGrootら、(1987) *J Gen Virol*, 68:2639-2646に発表されているが、欧州特許第264,979号50 にも、E2cDNA配列のクローニングが開示され、FIPVに対する

ワクチンとして利用することが述べられている。

(発明の要旨)

本発明は、ネコ伝染性腹膜炎ウイルス(FIPV)の構造タンパクおよび非構造タンパクの合成および操作に用いられる手段を提供するものである。これらのタンパクは、動物のFIPVに対する曝露もしくはFIPVに対する感染性を診断するのに有用であり、サブユニットのワクチンとしても有用である。

ある局面では、本発明は、FIPVの構造タンパクおよび非構造タンパクをコードする組換え体核酸配列に関する。特に、これらの配列には、N,E1,MS1、およびNS2、ならびにその生物学的誘導体の配列が含まれる。すなわち、E1,N,NS1、およびNS2からなる群から選択されるFIPVの構造タンパクまたは非構造タンパクをコードする、単離された、クローン化組換え体の、もしくは合成の核酸配列が含まれる他の局面では、本発明は、細胞を形質転換させるのに使用できる上記の核酸配列を有する組換えベクター、およびこれらの形質転換細胞によって産生される組換えタンパクに関する。さらに他の局面では、本発明は、組換え技術を用いてこれらのFIPVタンパクを製造する方法に関する。該製造方法は、上記の形質転換細胞を、タンパクの発現に適した条件下で培養することと、および発現されたタンパクを回収することを包含する。さらに他の局面では、本発明は、FIPVに対するネコ被検体の曝露を診断する方法に関する。該診断方法は、(a)被検体の血清試料を、標識されたFIPVポリペプチドと共にインキュベートすること；および(b)標識されたFIPVポリペプチドと抗血清との間で免疫複合体が形成されているかどうかを決定すること；を包含する。FIPVに対するネコ被検体の曝露を診断する本発明の他の方法は、(a)被検体の細胞溶解物試料を、FIPV抗体と共にインキュベートすること；および(b)細胞溶解物とFIPV抗血清との間で免疫複合体が形成されているかどうかを決定すること；を包含する。

(発明の構成)

A. 定義

本願で用いる場合、「FIPVタンパク」もしくは「FIPVポリペプチド」という用語は、45Kのヌクレオキシアシドタンパク(N)、25K～35Kのトランスメンブラン糖タンパク(E1)および210Kのベプロマー糖タンパク(E2)を包含するFIPVビリオンの構造タンパク；他のコロナウイルス類でコードされるタンパクと類似し、FIPVゲノム内のオープンリーディングフレームで予示される非構造タンパクであって、第1図に示すDNA配列でコードされ、ここではNS1およびNS2と命名されるタンパクを包含する非構造タンパク；および上記のウイルスタンパクの組換え体と合成物との免疫原性フラグメント、を意味する。「FIPV遺伝子」という用語は、FIPVタンパクをコードする核酸配列として定義される。これらの用語は、いずれのサブグループもしくは株にも限定されない。

「生物学的誘導体」には、FIPVの構造タンパクもしくは非構造タンパクに対して少なくとも95%の相同性を有するFIPVの構造タンパクおよび非構造タンパクの突然変異体、およびFIPV抗血清との反応性で証明されるFIPVの免疫原性領域を包含する組換え体もしくは合成物のペプチド類が含まれる。

「作動可能に連結された」という用語は、その成分が通常の機能を実施するような形態に並置されていることを意味する。したがって、コード配列に作動可能に連結された制御配列もしくはプロモーターは、コード配列の発現を行うことができる。

「制御配列」は、所望のコード配列に適切に連結された場合に、このような配列との適合性を有する宿主内で発現を行い得る單一もしくは複数のDNA配列を意味する。このような制御配列は、真核宿主内および原核宿主内の両方に少なくともプロモーターを有し、また必要に応じて転写終結シグナルを有する。発現を行うのに必要もしくは有益な他の因子も固定することができる。本願で用いる場合、「制御配列」という用語は、単に、使用される特定の宿主内で発現を行うのに必要などんなDNA配列をも意味する。

本願で用いる「挿入ベクター」という用語には、ウイルスのゲノムに対して相同意向な組換えを媒介することができるプラスミド、コスマド、もしくはファージが含まれ、組換えにより得られた組換え体ウイルスによって、非相同意向な核酸配列が安定に保持される。本発明のある実施態様では、ワクシニアウイルスDNAから構築されたプラスミドが用いられる。

「発現ベクター」という用語には、上記ベクターによって保持される各組換え体遺伝子によってコードされるタンパクを合成することができるプラスミド、コスマド、もしくはファージが含まれる。このようなベクターは、独立して、適切な宿主細胞の染色体内で複製されるか、または該染色体に組込むことができ、所望のタンパクを発現する。

B. FIPV遺伝子のクローニング

FIPVの構造遺伝子および非構造遺伝子は、合成もしくは天然またはその組合せであってもよい。天然のFIPV遺伝子（または、そのタンパク）は、FIPV cDNAもしくは40ゲノムライブラリーを調製し、次いでウイルス遺伝子の存在についてスクリーニングすることによって得ることができる。メッセンジャーRNA群からcDNAライブラリーを調製することは周知であり、Huynhら(1984)が、DNA Cloning, Vol 1 : A Practical Approach (D.Glover編), pp. 49-78, IRL Press, Oxfordに詳細に記載している。一般に、ライブラリーが、ヌクレオチドプローブを用いたハイブリダイゼーションによってスクリーニングされなければならない場合には、いずれの挿入ベクターも適切であるが、λgt10は、非組換え体ファージに対して直接選択ができるので好ましい。ライブラリーが抗体プロー

ブを用いてスクリーニングされなければならない場合には、最も普通に用いられる発現ベクターは、 λ gt11である。この発現ベクターでは、クローン化されたコード配列が β -ガラクトシダーゼのコード配列に融合されている。

スクリーニングは、ポリペプチドに対して特異的な標識されたDNAプローブ、または遺伝子産物に対する抗体を用いて行われる。両方の方法は、いずれも普通の方法であり、文献には詳細に記載されている。適切な抗体は、精製したFIPVから調製することができる。適切なDNAプローブは、FIPV E2構造タンパクのアミノ酸配列、または第1図や下記の実験の項で例示されるE1,N,NS1、およびNS2のポリペプチドに対するヌクレオチド配列に基づいて得ることができる。

合成のヌクレオチド配列を調製する場合には、天然のヌクレオチド配列を修飾することが望ましい。例えば、所望の宿主によって優先的に認識されるコドンを使用することが好ましいことが多い。場合によっては、さらに、そのヌクレオチド配列を変更して制限部位を創製するかもしれません除去して、例えば便利な発現ベクターへの遺伝子配列の挿入を促進させるか、または得られたポリペプチド中の1つまたはそれ以上のアミノ酸を置換することによって安定性を増大させることができ。

合成のオリゴヌクレオチドは、Edgeら、Nature（前出）およびDuckworthら、（1981）Nucleic Acids Res., 9:1691に記載のホスホトリエステル法；またはBeaucageおよびCaruthers、（1981）Tet Letts., 22:1859およびMatticeucciおよびCaruthers、（1981）J Am Chem Soc., 103: 3185に記載のホスホアミダイト法によって調製される。また、市販の自動オリゴヌクレオチド合成機を用いて調製することもできる。

C.組換え体ウイルスワクチン

Mossらは、1983年発行のMethods in Gene Amplification, 3巻, Elservier-North Holland, 202~213、および1984年発行のJ Virol 49:857~864に、非相同遺伝子をワクシニアウイルスのゲノムに挿入することを記載している。これらの遺伝子は、次いで宿主内でウイルスの複製中に発現されて、これらの遺伝子産物やワクシニアに免疫応答する。この方法を用いて、インフルエンザ（Smithら、Proc Natl Acad Sci USA, 80:7155~7159 (1983) ; Benninkら、Nature, 311, 578 (1984)）、単純ヘルペス（Cremarら、Science, 228, 737~740 (1985)）；B型肝炎（Mossら、Nature, 311, 67~69 (1984)）、およびプラスモジウム・クノウレシー（Plasmodium knowlesi）（Smichら、Science, 224, 397~399 (1984)）を含む各種病原体からの攻撃に対する、重要な免疫学的応答および/または防御が例示されている。

この技術には、ワクシニアウイルスのプロモーターの下流に非相同的FIPV遺伝子を有するプラスミド挿入ベクターの構築法が含まれ、前記のワクシニアウイルスのブ

ロモーターはすべて、該挿入ベクター内のワクシニアチミジンキナーゼ（tk）遺伝子に挿入される。ワクシニアウイルスに感染した細胞に対する。ワクシニアDNAと挿入ベクターとのコトランスクレオチド（cotransfection）によって、ウイルスDNA内のTK配列とプラスミド間の相同組み換えが可能になり、その結果、非相同的FIPV遺伝子がワクシニアゲノムに挿入され、ウイルス tk 遺伝子が中断される。組換え体ウイルスは、その tk 表現型によって容易に選択することができる。

10 D.ワクシニアウイルスのベクター

FIPVタンパクのコード配列は、組換え体ワクシニアウイルスを生成させるために、ワクシニアウイルスプラスミド挿入ベクターに挿入することができる。その結果、FIPVワクシニア組換え体は、（1）それぞれのFIPVタンパクの発現と分析、（2）FIPV抗体の产生、（3）組織培養物中での死菌免疫原もしくは不活性化免疫原としてネコに用いるFIPVタンパクの产生、または（4）生きているウイルス免疫原としてネコに用いるのに利用することができる。

20 本発明では、プラスミドのpSC11とpUV1を、FIPVタンパクの発現と、FIPVワクシニア組換え体の生成に用いた。NS1, NS2, E1およびNのコード配列を含有するプラスミドで形質転換されたE. coliの試料は、プラベスト条約に基づいて、米国、メリーランド州、ロックビル、パークロードライブ12301にあるアメリカンタイプカルチャコレクション（ATCC）に1988年8月30日に寄託した。3種のプラスミドの名称は、p64-FIPV6, pBR329-FIPV9、およびpBR329-E2#2であり、それぞれ67784, 67783および67782という受託番号が与えられた。第1図に示す、これらのプラスミドは以下のヌクレオチド配列を含む：すなわち、pBR329-E2#2 (1~2784); pBR329-FIPV9 (2049~3896)；およびFIPV6 (3673~5130) である。

30 FIPV組換え体を產生するために、2種のワクシニアウイルス挿入ベクターpSC11 (Chakrabartiら、Mol Cell Bio 1 (1985) 5, 3403~3409) とpUV1 (Falkner, F.G.ら、Nucleic Acids Research (1987) 15, 7192) を用いた。両ベクターはともに、第2図Aに示す共挿入（co-insertion）種に属する。これらのベクターは、2つのワクシニアウイルスプロモーターを有する。その一方のプロモーター（P1）は選択可能なマーカー遺伝子の発現を駆動するのに用いられる（この場合 β -ガラクトシダーゼ）。他方のプロモーター（P2）は非相同的FIPV cDNA挿入体の発現を駆動するのに用いられる。両者には、野生型ワクシニアウイルスゲノムへの相同組換えを促進し、選択機構（tk-ウイルスの生成）を提供するワクシニアウイルスDNA（中断されたチミジンキナーゼ（tk）遺伝子）が隣接している。pSC11ベクター（第2図B）は、ワクシニア初期-後期プロモーター（P7.5）を利用して非相同遺伝子の発現を駆動し、单一のSmaI クローン部位を有する。pUV1ベクター（第2図C）は、ワクシニア後期

プロモーター(P11)を利用して非相同遺伝子の発現を駆動し,P11後期遺伝子のATGの後の融合タンパクを発現させるよう設計されている。すべての場合,FIPV-pUV1の構築物は、天然のFIPVタンパク配列に追加のアミノ末端アミノ酸が導入されることを回避するために、最も5'末端側(ATGの後)のクローン部位(EcoRI)を利用して行った。

E.組換え体発現ベクターと宿主

当業者に理解されるように、本願に記載されているFIPV遺伝子を発現するのに、真核系と原核系の両者を用いることができる。原核生物としては、*E.coli*の各種菌株が提示される場合が最も多いが、他の微生物の菌株も使用できる。宿主と適合しうる種由来の複製部位、選択可能なマーカーおよび制御配列を有するプラスミドベクターが使用される。例えば、*E.coli*は、一般に,pBR322(Bolivarら, *Gene*, 2,95 (1977))による、*E.coli*の種由来のプラスミド)の誘導体を用いて形質転換される。pBR322は、アンピシリンとテトラサイクリンに耐性の遺伝子を有し、その結果、所望のベクターを構築する際に、残しておくか、または破壊することができる多重の選択可能なマーカーを提供する。通常用いられる原核制御配列は、本願では、リボソーム結合部位配列とともに、任意にオペレーターと、転写を開始するプラスミドとを含有すると定義されている。この原核制御配列には、β-ラクタマーゼ(ペニシリナーゼ)とラクトース(lac)のプロモーター系(Changら, *Nature*, 198,1056 (1977)),トリプトファン(trp)プロモーター系(Goeddeら, *Nucleic Acids Res.*, 8,4057 (1980)),ラムダ由来のP_lプロモーター(Shimatakeら, *Nature*, 292,128 (1981)),N遺伝子リボソーム結合部位およびtrp-lac(trc)プロモーター系(AmannとBrosius, *Gene*, 40183, (1985))のような通常用いられるプロモーターを含む。

細菌に加えて、酵母のような真核微生物も宿主として使用できる。サッカロミセス・セレビシエ(*Saccharomyces cerevisiae*)の実験室菌株である製パン用酵母が最もよく使用されるが、他の多数の菌株もしくは種も通常利用できる。例えば,Broach,Meth Enz, 101,307 (1983) の,2ミクロンの複製起源、または他の酵母に適合しうる複製起源(例えば,Stinchcombら, *Nature*, 282,39 (1979); Tschumperら, *Gene*, 10,157 (1980); およびClarkeら, *Meth Enz* 101,300 (1983) 参照)を使用するベクターを用いることができる。酵母ベクターの制御配列は、解糖酵素合成のプロモーター(Hessら, *J Adv Enzyme Reg* 7,149 (1968); Hollandら, *Biochemistry* 17, 4900 (1978))を有する。当該技術分野で知られている別のプロモーターには、3-ホスホグリセリン酸キナーゼのプロモーター(Hitzemanら, *J Biol Chem*, 255,2073 (1980))が含まれている。増殖条件および/または遺伝背景によって制御される転写の別の利点を有する他

のプロモーターは、アルコールデヒドロゲナーゼ2,イソシトクロムC,酸性ホソファターゼ、窒素代謝と関連のある分解酵素類、およびマルトースとガラクトースの利用に関与するα因子系と酵素のプロモーター領域である。ターミネーター配列は、コード配列の3'末端の位置にあることが望ましいと考えられる。このようなターミネーターは、酵母由来の遺伝子のコード配列に続く3'側の非翻訳領域に見出される。

もちろん、多細胞生物由来の真核宿主細胞培養物中で、ポリペプチドをコードする遺伝子を発現させることも可能である(例えばAxelらの米国特許第4,399,261号参照)。これらの系は、追加の利点として、インtronをスプライスする能力を有するので、ゲノムフラグメントを直接発現するのに用いることができる。有用な宿主細胞系には、VERO,HeLa,ベビーハムスターの腎臓(BHK),CV-1,COS,MDCK,NIH 3T3,L、およびチャイニーズハムスターの卵巣(CHO)細胞が含まれる。有用なネコ宿主細胞としては、クランドール(Crandall)ネコ腎臓細胞(CRFK)とネコ全胎児(FCFW)が挙げられる。このような細胞の発現ベクターには、サルウイルス40(SV40)(Firesら, *Nature*, 273,113 (1978))由来の通常用いられる初期と後期のプロモーター、またはポリオーマ、ヘルペスウイルス、アデノウイルス2、ネコ白血病ウイルスもしくはトリ肉腫ウイルス由来の他のウイルスプロモーターなどの哺乳類細胞と適合しうる、プロモーター類と制御配列が一般に含まれている。制御可能なプロモーターであるHMT II(Karinら, *Nature*, 299,797~802 (1987))も使用できる。哺乳類の細胞宿主系の形質転換の一般的な態様なAxelの前記文献に記載されている。

昆虫の発現系もFIPV遺伝子を発現するのに利用することができる。例えば、バキュロウイルス多角体遺伝子が、非相同タンパクの高レベルの発現に利用されている(Smithら, *Mol Cell Biol*, 3 (12), 2156~2165 (1983); Summersら, "Genetic Engineering of the Genome of the *Autographa californica* Nuclear Polyhedrosis Virus" Banbury Report:Genetically Altered Viruses in the Environment, 22,319~339, (1985), Cold Spring Harbor Laboratory)。

F.安定して転写された細胞系の生成

ワクシニア中で発現されたFIPVcDNAクローンも、FIPVサブユニットタンパクを発現する、安定にトランスフェクされた細胞系を生成させるのに使用できる。一般に、これらの細胞系は、2つの発現プラスミドの一つを最初に構築することによって生成される。両発現プラスミドには、選択可能なマーカーが、SV40初期プロモーター、それ自身のプロモーターを含む細菌カナマイシン耐性遺伝子、SV40の介在配列、および初期領域由来のSV40ポリアデニル化部位で構成されたG418ネオマイシン発現カセット(neo)によって与えられる。第1の発現プラ

スミドでは、FIPVcDNAクローニング部位には、5'末端には、SV40エンハンサーで修飾された、ヒトメタロチオネイン遺伝子プロモーターであるpMT IIaが隣接し、3'末端には初期領域由来のSV40ポリアデニル化部位が隣接している。第2の発現構造では、FIPV cDNAクローニング部位には、5'末端に、特にネコの細胞中で機能するプロモーター機能を与えるネコ白血病ウイルス(FeLV)の長い末端繰返し配列(LTR)が隣接し、3'末端には、SV40初期領域もしくはβ-アクチン遺伝子の配列のような、有用なポリアデニル化部位をコードする配列が隣接している。

上記の各ベクターは、特に限定はないが、下記実施例に記載したような哺乳類の細胞系に、リン酸カルシウム-DNA共沈降法もしくはエレクトロポレーション法(electroporation)によって形質転換することができる。1日後に、細胞を1mg/mlのG418で処理しG418耐性コロニーのプールを得る。成功裏に得られた形質転換体は、発現構築物中に含まれているFIPV cDNAを安定に継承し、次に低密度にプレートしてクローニング単離物を精製する。クローニング単離物を、所望のFIPVタンパクの最大産生量について分析し、高生産性のクローニングをワクチン種として役立つように増殖させる。

G. 診断用途

FIPVタンパク、またはこのタンパク由来の免疫原性ペプチドセグメントは、ネコが以前にFIPVに暴露されたか否かを決定する診断試薬として用いることができ、またネコのその疾病に対する感染性を決定する手段を提供する。このことは、多数のネコの生体試料を検定することによって行うことができる。第1に、ネコの血清は、FIPV抗体の存在を検定することができる。第2に、ネコから得た細胞溶解物もしくは全固定細胞は、FIPVタンパクが発現されているか否かを決定する検定を行うことができる。第1の場合、FIPVタンパクが診断手段である。第2の場合、FIPVタンパクに対する抗体が診断手段である。

本発明のFIPVタンパクに対する抗体を調製するのに、標準のプロトコルを用いることができる。ポリクローナル抗体とモノクローナル抗体の両者の製造法は、当該技術分野では公知である。簡単に述べれば、ポリクローナル抗体は、ウサギもしくはマウスのような動物に、FIPVタンパクをアジュバントと共に注射することによって調製される。FIPVタンパクは、カルボジイミド、グルタルアルdehyドまたは他の架橋剤を用いる化学的方法を利用してウシ血清アルブミンもしくはキイホール・リンベット・ヘマシアニン(keyhole limpet hemacyanin)のような担体タンパクに接合する必要がある。あるいはこのタンパクは担体タンパクに接合せずに投与してもよい。FIPVタンパクを発現しているワクシニア組換え体も、抗体を調製するのに利用できる。動物は、最初に免疫化してから数週間後に追加免疫を行う。10日～2週間後、動物から採血し、抗血清を集めて、力値を分析する。

モノクローナル抗体は、ポリクローナル抗体を形成している動物のB-リンパ球と、不活性化された骨髓腫細胞系とを、適切な条件下で融合させることによって、一般に調製される。B-リンパ球は、脾臓細胞もしくは末梢血液のリンパ球であってもよい。融合法は、当該技術分野で公知であり、一般に、細胞をポリエチレン glycolのような融合剤と混合することを含む。成功裏にハイブリドーマが生成したことを検定し、例えばHAT培地のような標準法で選択される。成功裏に得られたハイブリドーマから、所望の抗体を分泌するもののが存在について培養媒体を検定することによって、所望の抗体を分泌するものをクリーニングする。

ELISA法(enzyme-linked immunoassay), RIA法(Radioimmunoassay), IFA法(immunofluorescence assay)およびウエスタン・プロット分析法のような標準の免疫学的方法は、当該技術分野では公知であり、FIPVの診断スクリーニングに利用できる。基本的な検定原理の各種改変については、莫大な文献が現在存在しているが、その検定原理は、単に、標的被分析物が抗体と特異的に結合しなければならず、その結合が定性的におよび/または定量的に検出できるということだけである。蛍光、酵素もしくは放射性の標識が一般に用いられる。一般的な装置は、標識をつけた抗原(例えばFIPVタンパク)と被分析物との、抗体に対する競合を利用し、次いで結合画分と未結合画分を物理的に分離する。被分析物は、標識をつけた抗原の結合に対して競合し、その結果、多量の被分析物が存在すれば、多量の標識が未結合画分に残る。競合結合型検定法では、試料は、公知の力値の標識を付けたFIPVタンパクとFIPVタンパク抗体とともに培養される。次いで抗体-タンパク複合体を、公知の方法を用いて、複合体になっていない試薬から分離し、複合体化した物質中の標識の量を、例えばラジオイムノアッセイの場合はガム線を計数し、または酵素イムノアッセイの場合は光度を測定することによって測定する。試料中のFIPVタンパクの量は、いずれにしろ、標識の測定量と標準曲線との比較によって決定される。この基本原理の他の態様には、標識をつけた抗体そのものの使用；被分析物、抗-被分析物抗体および抗-抗体間の3系複合体を用い、これら成分の一つが標識をもっているサンドイッチアッセイ；および免疫吸着剤を用いて結合画分と非結合画分とを分離する分離法が含まれる。目視可能な沈澱が生じる凝集検定法も利用できる。(Linetら, J Clin Chem Clin Biochem 20, 142～147 (1982))。

さらに、抗血清を、ウイルスの伝染性を中和する能力について試験する。FIPV読み取り棒の産物もしくは機能が未知の遺伝子に対して生成する抗血清は、免疫応答を中和する潜在的な標的を同定するのに利用できる。この中和応答は、このような抗血清を動物検体に注射し、次いでFIPVで攻撃して応答を観察することによって検定できる。

このタンパクもしくはヌクレオチドのプローブは、自然に感染したFIPV疾患野ネコを、サブユニットワクチンで免疫化され、それ故全FIPVタンパクに対する抗血清を產生しないネコから識別する診断手段を提供する。

H.投与法と製剤法

本発明の方法によって創製された伝染性組換え体のウイルスもしくは細胞系はFIPVワクチンとして有用である。特に、本発明者らは、FIPVのNタンパクに対する機能性DNA挿入部を有するワクシニアウイルスからなる生菌ウイルスをネコに接種すると、その後のFIPVによる攻撃に対して免疫効果があることを例証した。非構造タンパクのNS1とNS2の一つもしくは両方を発現する組換え体のウイルスもしくは細胞系をワクチンとして利用して、ネコをFIPVに対して免疫化することは本発明の範囲内に考慮される。N,E1,E2,NS1およびNS2のタンパクの組合せを発現するか、その組合せからなる組換え体のウイルスもしくは細胞系が、FIPVワクチンとして使用されることも考慮されている。本発明のFIPVワクチンには、上記のタンパクもしくはタンパクの組合せ、または上記定義のその生物学的誘導体の免疫原性ペプチドのセグメントを含有するものが、さらに考慮されている。

ワクチンは種々の経路で投与され得る。例えば、非経口（皮下、皮膚内、腹腔内、筋肉内、胸骨内など）、鼻腔内エアゾール、または経口による方法がある。予防接種に用いられる投与量と投与の方法は、動物の年齢と体重、投与モードおよび処方物中のアジュバントの存在によって変えられ得る。個々の投与量は、通常100ng～1mgの範囲内の免疫原である。さらに、1つ以上のFIPVタンパクは、投与用の单一処方物に組合せ得る。先に示したように、ワクチン処方物は、免疫応答を開始させるのに用いるのが好ましく、次に死んだウイルスもしくは亜感染量の生殺ウイルスを注射する。予防接種は、一般に、一年目およびそれ以上にわたって周期的に追加免疫の接種を行う。本願で用いる場合、「免疫原量」という用語は上記のような投与量を含むものとする。

以下の実施例は、本発明をさらに例示するものであり、本発明を限定するものではない。

（実施例）

細胞を形質転換し、ベクトルを構築し、メッセンジャーRNAを抽出し、cDNAライブラリーを作製し、免疫検定を行うなどに用いる技術のほとんどは、当該技術分野で広く実施されており、ほとんどの当業者は、特定の条件や方法が記載されている標準法の資料に精通している。実施例は、このような知見に基づいて記載され、当該技術分野で一般的であると考えられる方法が援用される。

実施例1

FIPV cDNAのクローニング

A.cDNAライブラリーの合成

2つのcDNAライブラリーを、異なるウイルス源から構築した。第1ライブラリーは、フォート・ドッジII型FI

PV (Fort Dodge Type II FIPV, Black, Vet Med/Small Animal Clin, pp.811～814, 1980年5月) に感染させた細胞由来のポリ(A)⁺ RNAを用い、一方第2ライブラリーは、そのポリ(A)⁺ RNA源としてFIPVの79～1146単離物に感染させた細胞を用いた。二本鎖cDNAは、RNase H法の改変法 (D'Alessioら, Focus 9(1):1～4 (1987)) によって合成された。一般に、この改変法によって、単一チューブ反応による第1鎖と第2鎖のcDNAの合成が行われる。

10 第1鎖の合成は、 $10\mu l$ の5X反応緩衝液 (250mMトリス-塩酸緩衝剤pH 8.3; 375mM KC1; 50mM DTT; および15mM MgCl₂) , $2.5\mu l$ の10mM dNTP, $5\mu l$ の1mg/mlオリゴ-dT, $29\mu l$ のRNA+水, $2.5\mu l$ の400U/ μl モロニーウィルス逆転写酵素 (BRL), および $1\mu l$ の1U/ μl のRNasin (BRL) を用いて行った。第1のcDNAライブラリーについては、 $8.4\mu g$ のポリ(A)⁺ RNAを錆型として用い、そして $6.5\mu g$ のポリ(A)⁺ RNAは第2ライブラリーを生成させるのに用いられた。そのRNAは68°Cで3分間熱処理された後、反応混合物に添加された。反応混合物を20 37°Cで1時間インキュベートした。

第2鎖の合成には、 $45\mu l$ の上記mRNA:cDNAハイブリッド反応混合物を、 $64\mu l$ の5X第2鎖緩衝液 (95mMトリス-塩酸緩衝剤pH 8.3; 455mM KC1; 25mM MgCl₂; および20mM DTT), $6.4\mu l$ の10mM dNTP, $10\mu l$ の³²P-dCTP, $168\mu l$ の水, $16\mu l$ の1mg/ml BSA, $8\mu l$ の10U/ μl DNAポリメラーゼI (NEB) および2U/ μl RNase H (BRL) に直接添加した。この反応生成物を、16°Cで2時間インキュベートし、次いでEDTAを5mM添加することによって反応を停止させた。cDNAをフェノール/CHCl₃で1回抽出し、30 次いでCHCl₃で抽出し、そしてエタノールで沈殿させた。

次にcDNAがメチル化され、平滑末端処理されて、そしてこれにManiatisら [Molecular Cloning:A Laboratory Manual (1982) Cold Spring Harbor Press] の方法によってEcoR Iリソマーカーが添加された。EcoR I制御酵素で消化した後、cDNAを、EcoR Iで浄化してホスホターゼで処理したgt10の両アームに連結した (Huynhら, (1984), DNA Cloning, Vol.1:A Practical Approach (D.Glover編), pp.49～78, IRL Press, オックスフォード)。40 連結混合物を伝染性ファージ粒子 (Stratagene) 内に充填し、次いで充填されたファージを、E.coli (C600 hfl A) 上で増殖させた。

B.NS1,NおよびE1遺伝子の単離

1.プローブの合成

第1cDNAライブラリーを、「サブトラクテッドプローブ (subtracted probe)」でスクリーニングした。このプローブは、第1鎖cDNAをFIPVに感染させた細胞由来のRNAから合成し、錆型のRNAをNaOH処理で除き、そして得られたcDNAを未感染の細胞から調製した過剰のRNAと雑種形成させることによって生成させた。この雑種形成に

続いて、cDNAを、プローブを煮沸することなしにフィルターに添加した。ウイルスに特異的でそのため過剰のRNAと結合しないcDNAだけが、フィルターのブラークとの結合に利用され得る。

プローブのcDNAは、 $10\mu l$ の $5\times$ 反応緩衝液、 $2.5\mu l$ の 1mM dATP, TTP, dGTP, 10mM MgCl₂, $5\mu l$ の $^{32}\text{P}-\text{dCTP}$, $5\mu l$ のRNasinおよび $2.5\mu l$ のモロニーウィルス逆転写酵素（400単位/ μl , BRLから入手）を混合することによって合成された。上記混合物に、水中のRNA ($0.5\mu g$) を $24\mu l$ と、 65°C で15分間加熱した $5\mu l$ のランダムプライマー（水中で $50\text{mg}/\text{ml}$, Pharmaciaから入手）とを添加した。反応混合物を 37°C で1時間反応させ、次いでEDTAを 10mM 添加して反応を停止させた。NaOHを 0.2M 添加し、反応混合物を 65°C で1時間インキュベートしてRNAの錆型を加水分解した。反応液に、トリス-塩酸pH8を 0.2M 添加して中和し、次いで 1M HClを添加してpHを7に調整した。

次に、 $10\mu g$ の酵母tRNA添加し、次いでNH₄OAcを用いてcDNAを沈澱させた。得られたcDNAを「サブトラクションRNA (subtraction RNA)」とバナジルリボヌクレオシド複合体（BRLから入手したVRC）を 10mM の最終濃度まで添加した水中で可溶化させた。この溶液を、 65°C で5分間加熱し、次に、雑種形成溶液（ $75\mu l$ の $20\times$ SSC, $30\mu l$ の 0.5M HEPES pH6.9, $120\mu l$ のホルムアミド, $15\mu l$ の 200mM VRC, および $60\mu l$ のサブトラクションRNA, cDNAおよび水）に添加した。後者の溶液を一夜 42°C でインキュベートし、次いでcDNAをフィルターに添加した。

フィルターを、 $5\times$ SSPE, 40%ホルムアミド, 0.5%脱脂乾燥牛乳, 0.1%SDSおよび $10\mu g/\text{ml}$ のtRNAの中で、 37°C で一夜雑種形成させ、 $0.2\times$ SSC内で 50°C にて洗浄した後、フィルムに暴露させた。

2.cDNAの分析

サブトラクティッドプローブで同定された8個のクローンを、標準の方法に従ってブラークで精製した。ファージDNAを調製し、EcoRIによる消化を行った。最大の挿入部を有する2つのクローンを次の試験をするのに選んだ。FIPV #6c DNAは長さが約1.6kbで、FIPV #9 cDNAは約3.1kbの長さである。

クローン#6からの最初の配列は、TGEV配列に対して

相同性を示した。クローン#9はTGEV配列に重なり、かつ延出しており、FIPVのNS1とNの遺伝子の全配列を誘導するために利用された。これらの遺伝子の配列を第1図に示す。クローン#9は、E1遺伝子の5'末端まで完全には延出しなかったので、第1cDNAライブラリーを、クローン#9のアミノ末端配列由来のオリゴヌクレオチド（5' - TCGTAAGCGCTAGAACAA - 3'）でスクリーニングした。そのオリゴヌクレオチドを、標準法にしたがって $^{32}\text{P}-\text{ATP}$ を用いてキナーゼ処理を行い、次に $6\times$ SSPE, $1\text{mg}/\text{ml}$ ヘパリン、0.5%脱脂乾燥牛乳および0.1%SDS中で雑種形成を行った。フィルターを 37°C で一夜雑種形成させ、次いで、 50°C にて $6\times$ SSC内で洗浄してからフィルムに暴露させた。

E1配列の5'末端からさらに200bp延出したクローンを単離した（#3a-2）。このようにして完成したE1配列を得た。FIPVクローン#9と#3a-2が、E1遺伝子とN遺伝子の全配列をコードするフラグメントを生成させるために用いられた。クローン#3a-2を標準条件下でEcoRIとSspIの制限酵素で消化して、約200bpのEcoRI-SspIフラグメントを単離した。クローン#9を類似の条件下で、EcoRI, SspIおよびSphI制限酵素を用いて消化した。約1.7kbのSspI-SphIフラグメントを、上記の消化生成物から単離し、そしてクローン#3a-2から単離した約200bpのEcoRI-SspIフラグメントに連結した。E1遺伝子とN遺伝子の全コード配列を含む上記の連結されたEcoRI-SphIフラグメントを、EcoRIとSphIで消化させたpUC18にサブクローン化し、得られたクローンをpUC18:E1-Nと命名した。フラグメントの単離、連結およびプラスミドへのサブクローニングの標準方法が本実験例を通じて適用された。正しくE1-Nの構築が行われているかは、ミニプレップドDNA (mini-prepped DNA) を増殖させ、次に得られたプラスミドDNAを制限酵素で消化することによって確認した。

実施例2

E2とNS2のcDNAの単離

E2をコードするcDNA配列を単離するために第2ライブラリーを用いた。下記表1に示すオリゴヌクレオチドプローブは、E2についてすでに刊行されている配列 (deGrootら、前出) から設計した。

表1

E2のオリゴ

オリゴの番号	スクレオチドの配列
7	AACTGTGTGGTATGAACA
8	TACGTTAACCTGTATGCA
9	AGAGCAGTTGTACCCACAC
10	ATTATCAGACGGTACACC
11	GTAATCTGTACAGGAGTC
12	CAGCCTATCAAATTGTGC
13	TTGTCTGGTTAGAGTCTG
14	TCTAGGCTGATACTAGT

雑種形成の条件は、オリゴスクレオチドのスクリーニングについて記載したのと同様である。各々、長さ6kbのcDNA挿入部を有する2つのcDNAクローンを単離し、pBR329にサブクローニングし、これらをp329(88):E2#1およびp329(88):E2#2と命名した。後者プラスミドはpBR329-E2#2と命名した。スクレオチドの配列とサンプロット法の実験結果からみて、これらのクローンは、刊行されたE2配列の463スクレオチドから始まり、E2の末端まで延出し、次いでNS2とE1に続いている。

実施例3

ワクシニアウイルス挿入ベクターの構築

5つの各FIPVタンパクをコードするFIPV cDNAをもっている組換え体ワクシニアウイルスをMackettおよびSmithの(J Gen Virol, 67:2067-2082, (1986)で総説されている)標準法で生成させた。この文献を参考として、ここに引用する。第2図に示す2つの共挿入ベクターのうちの1つ(もしくは両者を)各cDNAに用いた。pSC11ベクターは、cDNA挿入部で与えられたATGを有する单一の平滑末端クローニング部位(SmaI)を有する。pUV1ベクターは、多数のクローニング部位を備え、これらはすべてワクシニアP11プロモーターのATGの後に生成している。それ故に、すべてのpUV1-FIPVの構築物には、FIPVのコード配列が、p11のATGとのフレーム内に位置している必要がある。各構築物の詳細は次のとおりである。

pSC11-NS2:

NS2をコードする配列(n.t.641-853)を、pSC11のSmaI部位にサブクローニングされた、平滑末端XmnI(n.t.599)-PvuII(n.t.2124)フラグメントとして、pBR329-E2#2から単離した。n.t.641に位置するNS2のATGは、クローニング部位の3'側に出会う最初の開始コドンである。

pUV1-NS2:

NS2をコードする配列を、Tth111I(n.t.648)-PvuII(n.t.2124)フラグメントとして、pBR329-E2#2から単離した。Tth111I部位に突き出ている単一の塩基対はクレノウ試薬で充填された。pUV1ベクターは、EcoRIによる消化とクレノウ試薬による充填によって調製した。

次に、平滑末端とされたNS2フラグメントを、p11のATGの後にpUV1の平滑末端とされたEcoRI部位にサブクローニングした。その結果、FIPV-NS2のアミノ末端が、「met-a-sp-i-le-val-lys...」から「met-asn-phe-val-lys...」に変化する。この変形残基にはアンダーラインをついている。

pSC11-E1:

E1をコードする配列(n.t.1954-2739)を、クレノウ試薬によってEcoRI部位を平滑末端化したEcoRI(n.t.1921)-BalI(n.t.2759)フラグメントとして、pUC18:E1-N(実施例1参照)から単離した。このEcoRI部位が第1図の配列に存在しないのは、それがもとのラムダクローンの1つ(#3a-2;実施例1参照)に存在するリンカー部位であったからである。この部位の位置は、第1図に「[EcoRI]」で示してある。平滑末端EcoRI-BalI E1フラグメントをpSC11のSmaI部位にサブクローニングした。n.t.1954に位置するE1のATGは、クローニング部位の3'側に出会う最初の開始コドンである。

pSC11-N:

Nをコードする配列(n.t.2755-3885)を、pUC18:E1-NからMluI(n.t.2773)-SphI(n.t.3896)フラグメントとして単離した。SmaI-MluIリンカーを、5'末端に付加して、SmaIクローニング部位を与え、NのATGと、MluI部位の5'側に生じるコード配列とを元の位置にもどした。SphI-SmaIリンカーを3'末端に付加した。得られたSmaI-Nフラグメントを、pSC11のSmaI部位にサブクローニングした。

pUV1-N:

Nをコードする配列を、BalI(n.t.2759)-HindIIIフラグメントとしてpUC18:E1-Nから単離した。HindIII部位は、pUC18ポリリンカー領域によって供給された。このHindIII部位はクレノウ試薬によって充填された。得られた平滑末端とされたNフラグメントを、p11のATGの後のpUV1の平滑末端とされたEcoRI部位にサブクローニングした。このサブクローニング法によって、アミノ酸末端のN配列が、「met-al-a-thr-glu...」から「me-t-asn-ser-thr-glu...」に変化する。その変形

もしくは付加残基にはアンダーラインを付けてある。

pSC11-NS1:

NS1をコードする配列(n.t.3893-4195)を、SphI(n.t.3896)-EcoRI(n.t.5126)フラグメントとしてp64-FIPV6から単離した。リンカーをそのSphI部位に付加して, NS1のATGを戻し, 5' EcoRIクローン化部位を与えた。5' と 3' 側のEcoRI部位にクレノウ試薬を充填し, 平滑末端のNフラグメントをpSC11のSmaI部位にサブクローン化した。

pUV1-NS1:

上記の(リンカーを付加した後)EcoRI NS1フラグメントを, pUV1のEcoRI部位に直接サブクローン化した。その結果, アミノ末端のNS1残基が, "met-leu-val-phe . . ." から "met-asn-ser-met-leu-val-phe . . ." に変化する。付加した残基はアンダーラインをしてある。

pUV1-E2 5':

FIPV cDNAクローンp329(88): E2#2(実施例2参照)は, E2タンパクのカルボキシ末端までの約90%をコードするE2配列の3893個のヌクレオチドを有している。この配列は, deGrootらの配列(前記文献)のn.t.463の位置に位置するEcoRI部位から始まる(E2タンパクの終止コドンは, 第1図のn.t.572に生じる)。pUV1挿入プラスミドの構築は, 上記のE2配列を含む3921n.t.EcoRI-XmnI(第1図のn.t.599)フラグメントを精製し, 得られたフラグメントを, pUV1ポリリンカーのEcoRI-SmaI部位にサブクローン化する(第2C図参照)ことによって行った。その結果, E2タンパク配列がp11のATGとのフレームに位置し, 第1残基が "met-asn-ser . . ." になっている。deGrootらの正しいE2配列は "asn-ser . . ." 残基で始まる。

pSC11-E2:

5' E2 cDNA配列は, ポリメラーゼ連鎖反応(Sakiら, 1988年, science, 239巻, 487-491頁, およびStofletら, 1988年, Science, 239巻, 491-494頁)を利用して, FIPV1146 RNA(Pedersenら, Am J Vet Res, 45(1-2), 2580-2585頁, 1984年)から生成させた。平滑クローニング部位を, 変性していないE2のATGの5'側に構築して, 全E2フラグメントが, 5'側平滑部位と, pUV1-E2 5'の構築実施例で述べた3'側XmnI部位とを用いて, pSC11のSmaI部位にプラントすることができるようとした。

pUV1-E2:

部位試行突然変異誘発法を用いて, EcoRI部位を変性していないE2のATGの後に挿入して, n.t.463までの5' E2配列を, EcoRIフラグメントとして単離することが可能になり, 次いでこのフラグメントをpUV1-E2 5'構築物のEcoRI部位に挿入する。得られた構築物は, p11開始コドンの後に完全なE2配列を有する。そのアミノ末端のE2配列 "met-ile-val-leu-val . . ." は "met-asn

-ser-leu-val . . ." になる。変異残基にはアンダーラインをしてある。

実施例4

ワクシニアウイルス組換え体の生成

実施例3に記載のワクシニア挿入ベクターを用いて, 以下のようにしてFIPV-ワクシニア組換え体ウイルスを生成した。

FIPV-ワクシニアウイルス組換え体の調製

60mmの皿内のCV-1細胞の集密的細胞単層に, ワクシニアウイルス[ウイス株(Wyeth strain)]を, 0.05pfu/細胞の感染多重度(moi:モイ)で感染させた。感染させてから2時間後, 細胞に, 10μgの挿入プラスミドDNAと0.5μgの野生型ワクシニアウイルスDNAをリン酸カルシウム沈降法でトランスフェクションさせた。細胞を完全培地に入れ, 37°Cで2日間インキュベートした。単層を集めて, TKワクシニアウイルスを, 25μg/mlの5-ブロモデオキシリジン(BudR)の存在下, TK143細胞上で選択した。感染させてから48時間後, 単層を, 300μg/mlの5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリル-B-D-ガラクトビラノシド(xgal)を含有する1%のアガロースで覆った。4~6時間後, 青色のブラークを採取し, さらにBudRとXgalの存在下でブラークの精製を2回追加して行った。FIPV-ワクシニア組換え体ウイルスの株をTK143, CV-1もしくはVEROの細胞内に作製した。組換えウイルスDNAを各株から作製し, サザーンプロット分析した結果, 適切なFIPV cDNA挿入部を有し, 野生型または自然のTKワクシニアで汚染されていないことが分かった。

組織培養物中でワクシニアウイルス組換え体によって產生されたFIPV-特異性ポリペプチドの同定

FIPV I型とFIPV II型を感染させたFCWFもしくはCRFKの組織培養細胞由来のFIPV構造タンパク(N, E1およびE2)を特異的に免疫沈降させたネコの腹水の試薬はすでに同定された。CV-1細胞に, ワクシニア-FIPVのE1, NもしくはE2の組換え体を, 5~10のモイで感染させて [³⁵S]メチオニンで放射能標識をつけると, 感染細胞溶解物を調製することができ, 予想される分子量のFIPV特異的ポリペプチドをネコの腹水の試薬で免疫沈降させることができる(PAGE分析法による)。NS1とNS2との組換え体の場合には, これらのまだ同定されていないFIPVでコードされたタンパクを認識する免疫学的試薬は入手できなかった。しかし, NS1とNS2との組換え体に対してラビットに生じた抗血清は, FIPVウイルスを感染させた細胞から新規なポリペプチドを特異的に免疫沈降させて, 模擬感染させた細胞からは沈降させないようにするのに用いることができる。このようにして非構造組換え体は, FIPVがコードするタンパクを作っていることを証明できる。

上記の組換え体ウイルス株は, 生きた免疫原として用いられるか, またはFIPVサブユニットタンパクが次に発

現される、感染可能な細胞の単層に感染させるのに用いられる。次にワクシニアで発現された組換え体FIPVタンパクを含有する単層を採取し、死菌免疫原として用いるために不活性化する。

実施例5

タンパクの調製

ワクシニアウイルスの増殖法

特に限定はないが、クランドール (Crandall) ネコ腎臓細胞 (CRFK), ウッド (Wood) のネコ細胞系 (FC), ネコ胎児の全胎児 (FCWF), 犬の腎臓細胞系 (DK), マジン・ダーピー・キャニン (Madin Darby Canine) の腎臓細胞 (MDCK), ベビーハムスターの腎臓細胞 (BH K), アフリカ緑ザルの腎臓細胞 (VERO) のような哺乳類の細胞培養物の100%の集密の細胞単層に、組織培養感染量 (TCID₅₀) もしくはブラーク形成単位 (pfu) で測定して、ウイルス対細胞の比率を1:10,000～1:10,好みしくは1:5000～1:100,さらに好みしくは1:1500～1:500にして、FIPV-ワクシニア組換え体ウイルスを接種した。最適に接種するには、細胞は、増殖容器内に、接種後約12～48時間以内、好みしくは24時間以内に、少なくとも100,000～1,000,000細胞数/cm²、好みしくは150,000～500,000細胞数/cm²細胞単層を形成するのに充分な量が存在していなければならない。ウイルスを、細胞に、28～38°Cにて、少なくとも60分間しかし300分間末端、好みしくは90～240分間で吸着させ、次に容器に維持培養液を再供給する。

TCID₅₀で測定して少なくとも1000粒子であるが通常50,000,000未満で、一般に5,000,000粒子であり、また細胞培養物において80%を上まわる細胞変性効果 (CPE) を示す採集可能なウイルス力価を、接種してから24～96時間後に得ることができる。細胞単層を多重凍結融解法で取出し、超音波処理し次いで不活性化あるいは凍結保存する。

特殊な例では、10個の850cm²のローラービンすなわちVERO細胞を洗い流し、各ローラービンに、5.21logTCID₅₀/mlの力価を有するFIPV-ワクシニアの種を添加した。各ローラービンには150,000,000の集密VERO細胞が入っており、ウイルス対細胞の比率のモイ値は1:100であった。ウイルスを、50mlのMEMで3時間吸着させ、次いで維持用のMEMを再度供給した。ウイルス液を接種してから72時間後に採取したが、ウイルスの力価は、6.25logTCID₅₀/mlであった。40×PEGで濃縮後（以下参照）、ウイルスの力価は8logTCID₅₀/mlであった。生きた免疫原として使用されるウイルス製剤も、10⁶～10⁹pfu/投与の接触濃度を達成するよう濃縮される。このような粗製ウイルス株は、動物を直接免疫化するのに用いてもよく、または凍結乾燥し次いで適當な希釈剤で再構成してもよい。

死んだ免疫原として使用されるウイルス製剤は、不活性化され、濃縮され、ついで標準のプロトコルでアジュバントが加えられる。

安定してトランスフェクションされた細胞系の増殖方法
構造上FIPVタンパクを発現する安定な細胞系を、850cm²のローラービンに100%の集密度で増殖させる。細胞が最大密度に達した後、細胞を、凍結融解を3回行って採取し、ウイルス液について記載したのと同様にして濃縮する。細胞系の液を不活性化し、濃縮し、次いで標準のプロトコルを用いてアジュバントを加える。

ウイルス液もしくは細胞系液のバイナリー (binary) エチレンイミン (BEI) による不活性化

10 プロモエチルアミン臭化水素酸塩の0.2モル溶液と水酸化ナトリウムの0.4モル溶液とを同体積混合し、約37°Cで60分間培養する。得られた環化不活性化剤は、バイナリーエチレンイミン (BEI) であり、ウイルス液もしくは細胞系液に0.5～4% (V/V) で添加される。不活性化中のウイルス液もしくは細胞系液は、周期的に攪拌しながら、4～37°Cで24～72時間保持される。

不活性化されたウイルス液もしくは細胞系液は、細胞培養を3回行い、特異的ウイルスの増殖量を検査して完全な不活性化について試験する。

20 ウイルス液もしくは細胞系液の濃縮

ウイルス液もしくは細胞系液は、アミコン (Amicon), ペリコン (Pellicon) (Millipore社) の濃縮装置のような有効な技術；塩化アンモニウムもしくボリエチレングリコールなどによる沈降法；カーボワックス液もしくはワックスを用いて透析管による濃縮法、またはリン酸アルミニウムのようなアジュバント濃縮法のいくつかを用いて、2～50倍濃縮される。PEGによる濃縮法では、80mlの50%PEGを1ℓのウイルス液もしくは細胞系液に加え、次いで一昼夜4°Cで混合する。翌日PEG-ウイルス液を2500RPMを上まわる回転数で遠心分離し、上澄液を廃棄し、得られたPEG-ウイルスのペレットを、正しい体積培地に再度懸濁させて所望の濃度とする。

30 ウイルス液もしくは細胞系液へのアジュバント添加

以下のアジュバントを、動物の皮膚硬化反応とアジュバントの混合適合性によって、単独もしくは2種以上組み合わせて用いてもよい。

40 水中に1% (W/V) の濃度で調製した、エチレンマレイン酸無水物 (EMA) を、不活性化したウイルス液もしくは細胞系液に、0.01～6% (V/V) 添加した（単独もしくは他のアジュバントと組み合わせて濃縮）。得られた液のpHを、1Nの水酸化ナトリウム溶液を添加して7.1～7.7に調節する。

ネオクリールA640 (Neocryl A640) とは、(スチレンと、アクリル酸とメタクリル酸との混合物との)コポリマーのラテックスエマルジョンの商品名である。ネオクリールA640は、スチレンを含有する、非融合性の水性アクリルコポリマーであり、pHは7.5、粘度が100cps (Brookfield 25°C) であり、1ガロン当りの重量は、40重量% 固形分および38容量% 固形分で供給された場合、8.6ポンドである。A640という数字はそのグレードを示す。他の有

用なネオクリールのグレードは520,625および966である。以下に用いられる「CSMA」という用語はスチレンと、アクリル酸とメタクリル酸との混合物とのコポリマーを意味する。50% (V/V) の水中懸濁液として調製されたCSMAを、不活性化したウイルス液もしくは細胞系液に,0.2~10容量%で、単独もしくは他のアジュバントと組み合わせて添加する。CSMAは中性pHであるから一般にpHを調節する必要はない。

最近の家畜用製品で(Onaka, NE), 小動物用のエマルシゲン(Emulsigen)アジュバントは、水中油滴型エマルジョンで、ウイルス液もしくは細胞系液に1~20% (V/V) で単独もしくは他のアジュバントと組み合わせて用いられる。

アブリジン(Avridine)が,5~30mg/投与で単独もしくは他のアジュバントと組み合わせて用いられる。2.4mgのアブリジンを18mlの無水エチルアルコールに溶解し、次に1.8mlのTween-80を添加し、得られた混合物を0.2ミクロンフィルターで濾過する。次に20.2mlの脂質内大豆油を上記のアブリジンに無菌で添加する。次いで、このアジュバントを、ウイルス液もしくは細胞系液に7~50% (V/V) で添加する。

サボニンが,0.01mg~5mg/投与の量で単独もしくは他のアジュバントと組み合わせて使用される。サボニンは,200mg/mlの濃度で調製され、フィルター滅菌され、次にウイルス液もしくは細胞系液に,0.01~50% (V/V) で添加される。

0.01~5mg/投与のリン酸アルミニウムまたは0.5~20mg/投与の水酸化アルミニウムも、単独もしくは他のアジュバントと組み合わせて用いられる。

細胞とウイルスの増殖培地

ワクチン製造時に、細胞を、ビタミン類、非必須アミノ酸、ビルピン酸ナトリウム、重炭酸ナトリウムおよびL-グルタミンを補充した最小必須培地(MEM) 中で増殖させた。30μg/mlのゲンタマイシンを、上記培地に、

防腐剤として添加し、ウシ血清を、細胞増殖のために10%まで、維持培地として1%まで添加した。

実施例6

ネコによる試験：ワクチンの効力

予防接種されたネコに対する病毒性FIPVの攻撃の効果を観察することによって、効力もしくは免疫防御性を評価しうる。免疫化させたネコの免疫状態評価する際に、血清中のサブユニット特異的抗体もしくは中和抗体の力値を決定することはほとんど価値がない。従来、特異的抗体の力値と、防御性との間には相関がなかった。実際に、(中和性もしくは非中和性)高力値のFIPV特異的抗体をもったネコは、一般にウイルスの攻撃により病氣にかかりやすくなったり、疾病に敏感になり病状が悪化しやすい。しかし、免疫化したネコの血清学的プロファイルを得ることは、特にFIPV I型FIPV II型間の交差防御性を評価する際に有用である。ネコにワクチンの試験を実施する方法は次のとおりである。

ネコは、3週間の間隔をあけて0日目と21日前に候補のワクチンを1ml投与量ずつ2回予防接種される。不活性化ワクチンの場合、アジュバントが、各投与量の10~50%を占める。不活性化ワクチンは筋肉内に投与される。生ワクチンは、乱切法、筋肉内法などで投与される。予防接種されたネコと対照のネコは、35日目に、経口/鼻腔内ルートで、1:10,000に希釀されたFTPV79-1146の5mlで攻撃され、熱と腹水について監視される。35日目の攻撃された日から、研究が終わるまで、ネコは、ネコどうしが接触しないように別々のかごにいれてある。ネコは、0,7,14,21,28,35,42,49,50,70,77,84,91,105および12日目に、I型とII型に対するIFA、I型とII型に対するSN、ならびに抗FIPVサブユニット(タンパク、またはワクチンの組合せによる)の抗体の測定用に採血した。生き残った被検体に対する、第2の攻撃は、第1の攻撃をしてから5~6週間後に行った。

表2

ワクチン	試験	死亡率			死亡開始の日			防御性			合計	平均
		%	日	ランク	%	日	ランク	%	日	ランク		
PSC11 N/live	1-2	1.207	1.218	1	1.102	1.942	3	41.7	25	5	1.67	
Controls	1+2	1.317	1.317	2	1.333	1.333	6	25	25	10	3.33	
PCV1 N/NG1	2	2.328	2.328	3	1.946	1.946	4	25	25	10	3.67	
PCV1 N/EVN	1-2	2.382	2.382	7	21.3	21.3	1	0	3	11	3.67	
PCV1 N/AS	1	8.48	8.48	8	20.5	20.5	2	0	3	13	4.33	
PCV1 N/Live	1	1.661	1.661	4	4.5	4.5	7	0	0	14	4.67	
全	1146/EN	1	2.473	6	0.286	0.286	8	0	0	17	3.33	

各カテゴリーのランキングは、連続する相対順位で決定した。例えば最低の死亡率、死亡開始前の期間が最長のもの、および防御性が最大のものには1のランクを与えた。合計のランクは、各カテゴリーの個々のランクを合計して計算した。平均のランクは、カテゴリーの合計数の3で割り算することによって計算した。

- 1) 死亡率/日は、死亡率対攻撃後の日数のプロットの直線回帰分析によって得られた直線の勾配から決定した。
- 2) 死亡開始の日は、攻撃後の日数対死亡率の直線回帰分析によって生成したY軸の切片から決定した。

“FIPVタンパク”という用語は、一般に,N,E1,NS1およびNS2から選択された各タンパクを含めて包括的な意味で用いられる。実施例7と8の診断検定法に上記タンパクのいずれも用いることができる。

実施例7

放射線免疫検定法による診断試験

7A.ポリクローナル抗体の調製

50 実施例5のFIPVタンパクを、標準のタンパク精製法を

用いて精製する。5mgの精製FIPVタンパクを、2段階の工程でカルボジイミドを用いて、キーホール・リンベット・ヘモシアニン(KLH)に接合させる。タンパクと5mgのカルボジイミドとを、1mlの1mM HCl中で、4°Cにて15分間インキュベートする。9mlの1mM NaOH(25°C)を上記混合物に添加し、次いで5mgのKLHを添加する。反応混合物を一夜21°Cで振盪し、次いで10mM Na₂PO₄, 150mM NaCl(pH7.4)に対して2日間透析する。得られたFIPVタンパク/KLH接合体を、4:6の比率で、完全フロイントアジュバントを用いて乳化させ、250μgのタンパクを、5kgの雄のダッチベルテッドラビットの、皮下の多数の部位または直接鼠蹊部のリンパ節に注射する。これらラビットの後足に、3週間後、同じ製剤I.M.を注射して追加免疫を行う。10日後、動物から採血し、抗血清を収集して分析する。標準のエンザイムーリンクドイムノソルベントアッセイ(ELISA法)(E.Engvall, *J. Immunol.*, 109:129 (1972))を用いて、抗タンパクと対照の抗血清とが種々の抗原に結合する性質を試験する。

7B. 放射線免疫検定法

実施例5のFIPVタンパクを、標準の方法を用いて精製し、標準のプロトコルを用いて下記のようにしてヨウ素化する。Iodogen(Pierce Chemical Co. #28666)をクロロホルムに溶解して10μg/mlの濃度とし、その160μlを、12×75のガラス管に入れ、乾燥室素流下で蒸発させる。60μlの0.2Mリン酸ナトリウム(pH7.2)を前記ガラス管に添加する。精製FIPVタンパク(一般に3μg)をガラス管に添加して混合する。Na¹²⁵Iの2倍モル過剰量を添加して反応を開始させる。15分間、室温でインキュベートした後、60μlの0.1%のメタ重亜硫酸ナトリウムと30μlの0.1mMのヨウ化カリウムを添加して反応を停止させる。得られた反応混合物を、G-50セファデックスカラム(0.1mlの吸着床容積、リン酸緩衝塩水で平衡化する)に移し入れて、通過数を収集する。TCA沈澱液カウント数(TCA-precipitable counts)を測定し、その放射リガンドを-70°Cで貯蔵する。

放射線免疫検定法については、FIPVの、精製タンパク標準品またはネコ由来の白血球溶解物の試料100μlをレブリケートガラス管に小分けする。各管に、150cpm/μlを含むように希釈されたヨウ素化FIPVタンパク(前記のようにして調製したもの)の300μlと、前記7A項で調製し1/3000に希釈されたポリクローナルFIPV抗体100μlを添加する。全試薬は、RIA緩衝液(50nMリン酸ナトリウムpH7.4, 5mM塩化ナトリウムおよび2mMアジ化ナトリウム)で希釈される。得られた反応混合物を、一夜室温でインキュベートする。翌日、RIA緩衝液で1/10に希釈されたヤギ抗ラビットIgG 200μlを、反応混合物に加え、一夜室温でインキュベートする。次の日、各管を400rpmで30分間遠心分離し、上澄み液を吸引し、得られたペレットをガンマカウンターでカウントした。カウント数の多い試料は、その中心にごく少量のFIPVのタン

パクしか含有していないが、一方、カウント数の少ない試料はかなりの量のFIPVタンパクを含有している。所望により、標準曲線を描いて、それを試料中のFIPVの量を決定するのに用いることができる。

実施例8

ELISA法による診断試験

8A. モノクローナル抗体の調製

実施例5のFIPVタンパクを、標準のタンパク精製法を用いて精製する。8週齢のBalb/cマウスを、必要に応じて接合させ、アジュバントで乳化させた精製FIPVタンパクの100μgを皮下注射および腹腔内注射して免疫化する。マウスは、充分な抗血清の力値が達成されるまで、2～3週間の間隔で、50μgのFIPVタンパクとアジュバントで追加免疫化を行う。最後の追加免疫を行ってから3日後、マウスを殺し、脾臓を取出す。その脾臓を、Schneiderら、*Somatic Cell Genet.*, 5:263～269 (1979)に記載された、Ca²⁺と血清を含有しない培地(CSF)中ですすぎ、単一細胞懸濁液を調製する。得られた懸濁液を1000×gで10分間遠心分離し(Beckman TJ-6)，得られたペレットを、30mlのCSF中で3回洗浄する。

並行して、2×10⁵細胞数/mlの密度まで増殖させたSP2/0骨髄腫細胞100mlを、1000×gで10分間遠心分離にかけて採取する。2×10⁷の全細胞ペレットを30ml CSFで3回洗浄し、再度ペレット化する。最後に、上記のようにして得た脾臓細胞と、SP2/0骨髄腫細胞を合わせて遠心分離によってペレット化する。CSF中37% (V/V)の濃度のポリエチレン glycole (PEG, MW=1500, Koch-Light Laboratories, ハーバーヒル, 英国) 1mlを、上記の混合したペレットに、90秒間かけて、融合を促進するため連続的に攪拌しながら添加する。次に10mlのCSFを徐々に添加することにより上記のPEGを希釈し、細胞を再ペレット化し、CSF中で洗浄する。得られた細胞のペレットをHAT選択培地中で再懸濁させる。この培地は、RPMI 1640, 20%ウシ胎児血清、ヒポキサンチン、アミノブテリンおよびチミジンを含有する(Littlefield, *Science*, 145:709 (1964))。得られた細胞を、10×96ウェルのマイクロタイタープレートにプレートし、7%CO₂雰囲気中37°Cでインキュベートした。骨髄腫細胞は、HPRT酵素を欠いているので、脾臓細胞(この酵素を有している)とうまく融合したSP2/0細胞だけが、前記の選択培地中に生存する。細胞には、次の10日間に2回、選択培地が再供給される。

培養物が、マイクロタイターウエル表面の75～100%を覆う細胞密度に到達した後に、そのハイブリドーマからの培地を、固定プレート結合検定法(imobilized plate-binding assay)(R.H.Kennettら編集, *Monoclonal Antibodies* (1980), Plenum Press, ニューヨーク)を用いて、抗FIPV抗体の存在に対してスクリーニングする。50mMの重炭酸ナトリウム(pH8.3)で希釈した精製FIPVタンパクの1μgを、フレキシブルマイクロタイタ

29

プレートのウエルでインキュベートする。37°Cで3時間インキュベートした後、ウエルを洗浄し、マグロプロリンを含有しない20%のウマ血清を添加して、非特異的タンパク結合部位をふさぐ。ハイブリドーマを含有するウエルからの培地を加え、そのウエルを37°Cで2時間インキュベートし、特異的な抗FIPV抗体と結合させる。そのウエルを再度洗浄した後、そのウエル中で¹²⁵Iヒツジ抗マウスIgGを37°Cで2時間インキュベートすることによって、特異的に結合したモノクローナル抗体を検出する。洗浄したウエルをプレートから切り取り、結合した放射能をカウントする。対照の結合量の3倍もしくはそれを越える比率を陽性とみなす。ハイブリドーマが分泌するFIPV特異的抗体をサブクローン化し、プロテインAセファロースによって、分泌されたモノクローナル抗体の生産と精製のために増殖させる。

8B. ELISA法による検定

上記8A項で調製したモノクローナル抗体を $10\mu\text{g}/\text{ml}$ 含有する50mM重炭酸ナトリウム溶液(pH8.3)の $100\mu\text{l}$ づつで、96ウェルマイクロタイプレートの各ウェルを被覆する。37°Cで90分間、または4°Cで18時間インキュベートを行い、ウェルを緩衝液A(この緩衝液Aは、1%卵アルブミンと0.1%トウィーン20を含有するリン酸緩衝塩水である)で4回洗浄する。ネコの白血球の溶解物(1:10に希釈)もしくは精製FIPVタンパクの標準品を90~95μlの緩衝液Aに添加し、前記ウェルを、この混合物とともに室温で90分間インキュベートする。ウェルを緩衝液Aで再度4回洗浄し、上記実施例7Aで調製したラビット抗FIPVの緩衝液Aで1/5000に希釈した希釈液 $100\mu\text{l}$ で処理する。室温で90分間保持した後、各ウェルを緩衝液Aで再度4回洗浄する。この洗浄後、ヤギ抗ラビ

* ット IgGペルオキシダーゼ接合体 (Coppel Laboratories) の緩衝液Aによる1/3000希釈液100μlを各ウェルに添加し、そのプレートを上記のようにしてインキュベートして洗浄する。200μlの基質 (o-フェニレンジアミン+H₂O₂含有のクエン酸リン酸緩衝液, pH5) を各ウェルに加えて、結合した抗体を検出する。30分後, 50μlの4N硫酸を添加して呈色反応を停止させる。490nm波長光の吸光度をELISA読取り装置で読取る。溶解物中のFIPVタンパクの濃度は、標準曲線と比較して決定する。

10 本発明の実施する上記態様を変更したもので、免疫学、組換えDNA技術および／または獣医学の分野の当業者にとって自明なものは、上記の特許請求の範囲に含まれるものとする。

(発明の要約)

本発明は、ネコ伝染性腹膜炎ウイルス(FIPV)に対する動物の曝露あるいはFIPVに対する感受性を診断するために有用な手段を提供する。この診断手段は、構造FIPVタンパク及び非構造FIPVタンパクをコードする核酸配列と、FIPVタンパクに対して生成される抗体とを包含する。FIPVタンパクはサブユニットワクチンとしても有用である。

【図面の簡単な説明】

第1図は、NS2、E1、NおよびNS1の各ペプチドのヌクレオチドの配列と推定アミノ酸の配列を示す図である。各種のタンパクをコードする遺伝子の特異的DNA配列は次のとおりである。NS2=641～853ヌクレオチド；E1=1954～2739ヌクレオチド；N=2755～3885ヌクレオチド；およびNS1=3893～4195ヌクレオチドである。

第2図は、共挿入ベクターであるpSC11とpUV1を表わす図である。

〔第1図(その4)〕

4201	TCATGATTGTTGTAACCTTGTGTATCTTTGGCTAATGGAATTAAAGCTACTGCTG	4260
4261	TCCAAAATGACCTTCATGAACATCCCCTTCTACCTGGGATTTATTACAGCATTCAAG	4320
4321	GACATACCCCTCACATCACACACACACAGGCTTAGCACTACCGCTGGATCTCGTGTG	4380
4381	ACTGTGAGGGTATCGAAGGTTCAATTGCACATGGCCTGGCTTCAAGATCTGCACATG	4440
4441	ATCATATTGATTCTACTTGTACTTCTAACCTTCTATTCAATTGTAGATAATT	4500
4501	ATATTGTAAGTGAGGGAAATCAAAGAATCAACTCAGATGGTGGCTGTGCAAAAC	4560
4561	AAAAGAGATTAATGTGGTGTCAATCATATTGTGGTGTGATCTTCCATTGGGATTC	4620
4621	AGATATACCATGACAGGGATTTCACACCCCTGTTGATGGCAGACATCTAGATTGTACTC	4680
4681	ACAGAGTGTACTTGTGAAGTACTGTCCACATAACCTGATGGTTATTGCTTTAATGAGA	4740
4741	GGCTGAAAGTTTATGACTTGAAGCAATTCAAGAGCAAGAAGGTCTTCGACAAAATCAACC	4800
4801	ACATCATAAAATGAGTTATAAGGCAACCGATGTCTAAAATGGTCTTCCGAGGAAT	4860
4861	TACGGGTCTCGCGTGCCTACTCTTGTACAGAATGGTAAGCACGTGTAATAGGAGGTAC	4920
4921	AAGCAACCCATTGCAATTAGGAAGTTAGATTGATTGGCAATGCTAGATTAGTAA	4980
4981	TTTAGAGAAGTTAAAGATCCGCTATGACGGGCCAACATGGAAGAGCTAACGTCGGAT	5040
5041	CTAGTGTATTGTTAAATGTAAAATTGTTGAAAATTTCCTTTGATAGTGTACACAA	5100
ECORI		
5101.	AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAACCGAATTCT	5130

[第1図(その1)]

1	TCTAGATGACAAGTTCTATTGACCCCCAGAACACTATGTATCAGCCTAGAGTTGCACCTAG	60
61	TTCTGATTTGTTCAAATTGAAGGGTGTATGTTGTTGTCACCGCACTGTAATTGA	120
121	TTTGCTAGTATTATAACCTGACTATATTGACATTAATCAAACCTGTCACAGACATATTAGA	180
181	AAATTACAGACCAAACTGGACTGTACCTGAATTACACTTGATATTCAACGCAACCTA	240
241	TTTAATTCTGACTGGTGAATTGATGACTTAGAGTTAGGTAGAAAAGCTACATARCAC	300
301	TACAGTAGAACTTGCATTCTCATTGATAACATTAATACATTAGTCATCTGAATG	360
361	GCTCAATAGAATTGAACTTATGTAATGGCCTGGTATGTTGACTGATAACGGTT	420
421	AGTACTAGTATTGTCATACCACTACTGCTATTGCTGTTAGCACAGGTTGTGG	480
481	ATGCATAGGTTGTTAGGAAGTTGTCACTCTATATGAGTAGAAGACAATTGARAA	540
	X ₆₀₁	
541	TTATGAACCAATTGAAAAAGTCATGTCACATAATTAAAGTTAAGGATGTTGAATAAA	600
	NS2 Tth1111	
601	TTCCCTTAAGAACTAAACTTATTAGTCATTACAGGTCTGTATGGACATTGTCAAATCTAT	660
	MetAspIleValLysSerII	
661	TGACATATTCTGAGACCGCTGTACTTGACGAACCTGACCCTGCATACTTGCTGTAACCT	720
	eAspIlePheValAspAlaValLeuAspGluLeuAspArgAlaTyrPheAlaValThrLe	
721	TAAAGTAGAATTAAAGACTGGTAAACTACTTGCTGTATAGGTTTGGTGCACACACTTCT	780
	uLysValGluPheLysThrGlyLysLeuLeuValCysIleGlyPheGlyAspThrLeuLe	
781	TGAGGCTAAGGACAAAGCGTATGCTAACGCTGGTCTCTCCTTATTGAAGAAGTCATAG	840
	uGluAlaLysAspLysAlaTyrAlaLysLeuGlyLeuSerPheIleGluGluValAsnSe	
841	TCATACAGTTGTTAGTATTACTGTTGAAACTAGACTTTGTATCATTAAACACACAAGA	900
	tHisThrValVal	
901	CCCAAAGCATTAAAGTGTACAAAACAAGTAAAGAGAGATTATGAAATTGCCATTCTA	960
961	AATTCCATGCCAAAATGATTGGGACTTTTCTTAACACTCTTAGTTGTAATTGTTA	1020
1021	TTAACCATGTTATTGTTAATAACACAGCAAATGTCATACTACACAAACATGAAATTGTTA	1080
1081	TAGTACACACAGCATTAGGTTAGTGTAGAACACAAAATTATTACCCAGAGTCAGCA	1140
1141	TCGCTGTACTCTTGATCATTGGCTTGACCGTAGTACAAACTTAAAGACGTGTG	1200
1201	TCGGCATCTTAATGTTAACGATTGATCAATGACACTTGAGGGCTATGCTTATAGCAT	1260
1261	ATGGTTACTACATTGATGCCATTGTTACAATAACTGTCTTAGCTTAAGATTTCCTACT	1320
1321	TAGCATACTTTGGTATGTTAATAGTAGGTCCGAATTATTTATACAATACACGACAC	1380
1381	TCATGTTGACATGCCAGAGCTGCACCGTTATGAGAACGCTCTCACAGCTCTATTATG	1440
1441	TCACATTGCTATGGCATAAAATTATATGTTGTAATGACCTCACGTTGCATTGAG	1500
1501	ACCCCTATGCTTGAAGAATAGCAATACGGCTTAGCTCATGCTGATCTAACTGTTTTA	1560
1561	GAGCAGTTGAACCTCTCAATGGTATTATATGTTACAGGAGGCCAGCCGG	1620
1621	TGTTTACAATGCAGCCTTCTCAGCGGTTCTAACGAAATTGACTTAAAGAAGAAGA	1680
1681	AGAAGACCATAACTATGACGTTCCCTAGGGCATTACTATCATAGATGACCATGGCATGG	1740
1741	TTGTTAGCGTCTCTCTGGCTCTGTTGATAATTATATTGATATTGTTCAATAGCAT	1800
1801	TGCTAAATGTTATTAAATTGTCATGGTATGTCATTTGCAATTGGTAAGACTATTATAGTAC	1860
1861	TACCTGCACGCCATGCATATGATGCCATATAAGACCTTATGCAAATCAAGGCATATAATC	1920
	[EcoRI] E1	
1921	CCGACGAAGCATTTGGTTGAACTAAACAAAATGAAGTACATTGCTAATACTCGCG	1980
	MetLysTyrIleLeuLeuIleLeuAla	
1981	TGCATAATTGCATGCCTTATGGTGAACGCTACTGTGCCATGCAAGACAGTGGCTTGCAG	2040
	CysIleIleAlaCysValTyrGlyGluArgTyrCysAlaMetGlnAspSerGlyLeuGln	

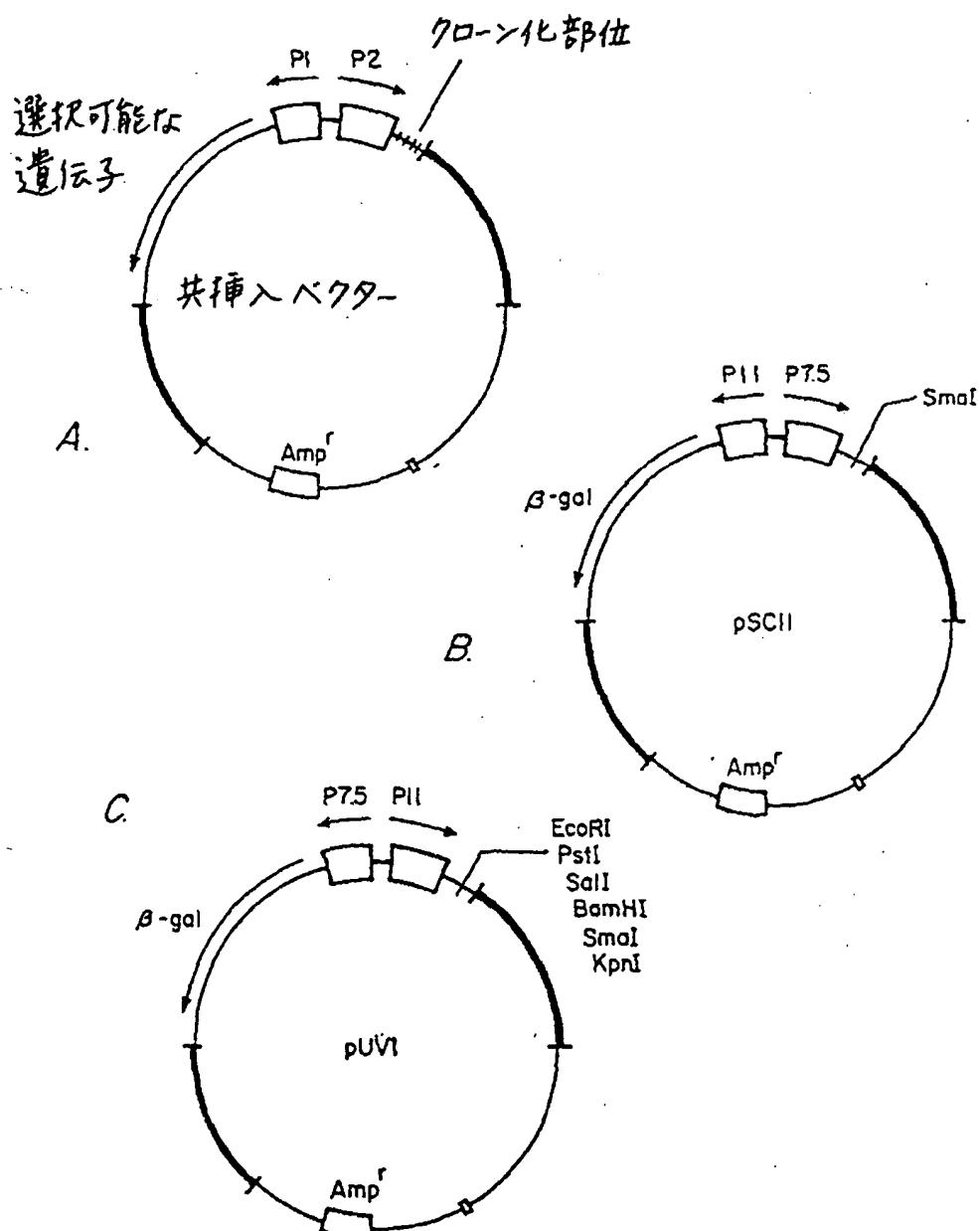
【第1図(その2)】

2041	TGTATTAAATGGCACAAAATTCAAGATGTCACACCTGCTTGAACGTGGTGATCTTATTGG CysIleAsnGlyThrAsnSerArgCysGlnThrCysPheGluArgGlyAspLeuIleTrp PvuII	2100
2101	CATCTTGCTAACTGGAACCTCAGCTGGTCTGTAATATTGATTGTTTATAAACAGTGTAA HisLeuAlaAsnTrpAsnPheSerTrpSerValIleLeuIleValPheIleThrValLeu	2160
2161	CAATATGGCAGACCACAATTAGCTGGCTCGTTATGGCATTAAAATGCTGATCATGTGG GlnTyrGlyArgProGlnPheSerTrpLeuValTyrGlyIleLysMetLeuIleMetTrp	2220
2221	CTATTATGGCCTATTGTTCTAGCGCTTACGATTTTAATGCATACTCTGAGTACCAAGTT LeuLeuTrpProIleValLeuAlaLeuThrIlePheAsnAlaTyrSerGluTyrGlnVal	2280
2281	TCCAGATATGTAATGTTCGGCTTACTGTTGCAGGTGCAGTTGTAACGTTGCACCTTGG SerArgTyrValMetPheGlyPheSerValAlaGlyAlaValValThrPheAlaLeuTrp	2340
2341	ATGATGTATTTGTGAGATCTGTCAGCTATATAGAAGAACCAAATCATGGTGGCTTT MetMetTyrPheValArgSerValGlnLeuTyrArgArgThrLysSerTrpTrpSerPhe	2400
2401	AATCCTGAGACTAATGCAATTCTTGTGTTAATGCATTGGTAGAAAGTTATGTGCTTCCC AsnProGluThrAsnAlaIleLeuCysValAsnAlaLeuGlyArgSerTyrValLeuPro	2460
2461	TTAGATGGTACTCCTACAGGTGTTACCCCTACTCTACTTCAGGAATCTATATGCTGAA LeuAspGlyThrProThrGlyValThrLeuLeuSerGlyAsnLeuTyrAlaGlu	2520
2521	GGTTTCAAAATGGCTGGTGGTTAACCATCGAGCATTGCTAAATACGTATGATTGCT GlyPheLysMetAlaGlyLeuThrIleGluHisLeuProLysTyrValMetIleAla	2580
2581	ACACCTAGTAGAACCATGTTATACATTAGTTGGAAAACAATTAAAGCAACTACTGCC ThrProSerArgThrIleValTyrThrLeuValGlyLysGlnLeuLysAlaThrThrAla	2640
2641	ACAGGATGGGCTTACTACGTAAAATCTAAAGCTGGTATTACTCAACAGAACGTACT ThrGlyTrpAlaTyrTyrValLysSerLysAlaGlyAspTyrSerThrGluAlaArgThr	2700
2701	GACAATTGAGTGAACATGAAAAATTATTACATATGGTGTAACTAAACTTCAAAATGCC AspAsnLeuSerGluHisGluLysLeuLeuHisMetVal MuI	2760
2761	ACACAGGGACAAACGGTCAACTGGGGAGATGAAACCTTCAAAAGACGTGGTCGTTCAAC ThrGlnGlyGlnArgValAsnTrpGlyAspGluProSerLysArgArgGlyArgSerAsn	2820
2821	TCTCGTGGTGGAAAGAATAATGATATACCTTGTCATTCTACAAACCCCATTACCGTCGAA SerArgGlyArgLysAsnAsnAspIleProLeuSerPheTyrAsnProIleThrLeuGlu	2880
2881	CAAGGATCTAAATTGGATTATGTCCGAGAGACCTGTTCCAAAGGAATAGGTAAT GlnGlySerLysPheTrpAsnLeuCysProArgAspLeuValProLysGlyIleGlyAsn	2940
2941	AAGGATCAACAAATTGGTATTGGAATAGACAGATTGCTTATCGTATTGTAAGGCCAG LysAspGlnIleGlyTyrTrpAsnArgGlnIleArgTyrArgIleValLysGln	3000
3001	CGTAAGGAACTCGCTGAGAGGTGGTTCTTACTCTTAGGTACAGGACCTCATGCTGAT ArgLysGluLeuAlaGluArgTrpPhePheTyrPheLeuGlyThrGlyProHisAlaAsp	3060
3061	GCTAAATCAAAGACAAGATTGATGGAGTCTTCTGGGTGCAAGGGATGGTGCACATGAAC AlaLysPheLysAspIleAspGlyValPheTrpValAlaArgAspGlyAlaMetAsn	3120

[第1図(その3)]

3121	AAGCCCACAAACGCTGGCACTCGTGGAACCAATAACGAATCCAAACCACTGAGATTGAT LysProThrThrLeuGlyThrArgGlyThrAsnAsnGluSerLysProLeuArgPheAsp	3180
3181	GGTAAGATAACCGCCACAGTTCAAGCTTGAGTGAACCGTTCTAGGAACAATTCAAGGTCT GlyLysIleProProGlnPheGlnLeuGluValAsnArgSerArgAsnAsnSerArgSer	3240
3241	GGTTCTCAGTCTAGATCTGTTCAAGAACAGATCTCAATCTAGAGGAAGACACCATTCC GlySerGlnSerArgSerValSerArgAsnArgSerGlnSerArgGlyArgHisHisSer	3300
3301	AATAACCAGAATAATAATGTTGAGGATACAATTGTAGCCGTGCTTGAAGAAATTAGGTGTT AsnAsnGlnAsnAsnAsnValGluAspThrIleValAlaValLeuGluLysLeuGlyVal	3360
3361	ACTGACAAACAAAGGTACAGTCTAAACCTAGAGAACGTAGTGATTCAAACCTAGGGAC ThrAspLysGlnArgSerArgSerLysProArgGluArgSerAspSerLysProArgAsp	3420
3421	ACAAACACCTAAGAATGCCAACAAACACACTGGAAGAAAAGTGCAGGCAAGGGAGATGTG ThrThrProLysAsnAlaAsnLysHisThrTrpLysLysThrAlaGlyLysGlyAspVal	3480
3481	ACAACCTTCTATGGTCCTAGAAGTAGTTCAAGCTAACTTGGTGATAGTGATCTCGTTGCC ThrThrPheTyrGlyAlaArgSerSerAlaAsnPheGlyAspSerAspLeuValAla	3540
3541	AATGGTAACGCTGCCAATGCTACCCCTCAGATAGCTGAATGTGTTCCATCAGTGTCTAGC AsnGlyAsnAlaAlaLysCysTyrProGlnIleAlaGluCysValProSerValSerSer	3600
3601	ATAATCTTGGCAGTCATGGCTGCTGAAGAACGCTGGTGATCAAGTGAAAGTCACGCTC IleIlePheGlySerGlnTrpSerAlaGluGluAlaGlyAspGlnValLysValThrLeu	3660
3661	ACTCACACCTACTACCTGCCAAAGGATGATGCCAAACACTAGTCATTCCTAGAACAGATT ThrHisThrTyrLeuProLysAspAspAlaLysThrSerGlnPheLeuGlnIle	3720
3721	GACGCTTACAACCGACCTCTGAAGTGGCTAAGGATCAGAGGCCAAAGAAGATCCCGTTCT AspAlaTyrLysArgProSerGluValAlaLysAspGlnArgGlnArgArgSerArgSer	3780
3781	AAGTCTGCTGATAAGAACGCTGAGGAGTTGCTGTAACTCTTGTGGAGGCATACACAGAT LysSerAlaAspLysProGluGluLeuSerValThrLeuValGluAlaTyrThrAsp	3840
3841	GTGTTGATGACACACAGGTTGAGATGATTGATGAGGTTACGAACTAAACGCATGCTCGT ValPheAspAspThrGlnValGluMetIleAspGluValThrAsn	3900
3901	TTTCGTCCATGCTGACTTGTAAACAGCTTTAATCTTACTACTAATTGGTAGAATCCAATT IlePheValHisAlaValLeuValThrAlaLeuIleLeuLeuIleGlyArgIleGlnLe	3960
3961	ACTAGAAAAGGTTGTTACTCAGTCATCTGCTTAATCTTACAACAGTCAGTAATGTTTAGG uLeuGluArgLeuLeuLeuSerHisLeuLeuAsnLeuThrThrValSerAsnValLeuGl	4020
4021	TGTGCCTGACAGTAGTCTGCCTGTAATTGTTGCAGCTTTGAAACCAAGACTGCCTTGA yValProAspSerSerLeuArgValAsnCysLeuGlnLeuLeuLysProAspCysLeuAs	4080
4081	TTTTAATATCTTACATAAAAGTTTAGCAGAACCCAGGTTACTAGTAGTAGTACTGCCAGT pPheAsnIleLeuHisLysValLeuAlaGluThrArgLeuLeuValValLeuArgVa	4140
4141	GATCTTCTAGTTCTCTAGGGTTTCTGCTATACATTGTTGGGTGCATTATTTAACAA IlePheLeuValLeuLeuGlyPheSerCysTyrThrLeuLeuGlyAlaLeuPhe	4200

【第2図】



P11 7D E-T--ATG AAT TCC TGC AGG TCG ACT CTA GAG GAT CCC CGG G
Eco RI Sma I

フロントページの続き

(51) Int.CI.⁶

C 12 P 21/02
21/08

識別記号

F I

C 12 P 21/08
C 12 N 5/00

B

(72)発明者 ビバリー デイル
 アメリカ合衆国 カリフォルニア
 94087 サニーベイル, ケネディック
 ドライブ 1507

(72)発明者 マイルス ヤマナカ
 アメリカ合衆国 カリフォルニア
 94086 サニーベイル, ナンバー 417
 イースト フレモント アベニュー
 880

(72)発明者 ウィリアム エヌ. アクリー¹
 アメリカ合衆国 アイオワ 50501 ノ
 ース フォート ダッジ, フィフス ア
 ベニュー 1218

(72)発明者 ロイド ジー. シャベ ジュニア
 アメリカ合衆国 アイオワ 50501 ノ
 ース フォート ダッジ, テンス アベ
 ニュー 1302

(56)参考文献 Virology, 1988, Vol.
 167, No. 2, p 370-376
 J. gen. Virol. 1987, Vo
 l. 68, No. 4, p 995-1002
 Biochimie, 1987, Vol.
 69, No. 6/7, p 591-600

(58)調査した分野(Int.Cl.⁶, DB名)

C12N 15/00 - 15/90
 C12N 1/00 - 7/08
 BIOSIS (DIALOG)
 WPI (DIALOG)
 Genbank/EMBL/DDBJ

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.